

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

550671

(43) 国際公開日
2004 年 10 月 7 日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/085629 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 1/21, 9/04, 15/09
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004074
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 24 日 (24.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-082739 2003 年 3 月 25 日 (25.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 Kyoto (JP). ユニチカ株式会社 (UNITIKA LTD.) [JP/JP]; 〒6600824 兵庫県尼崎市東本町 1 丁目 5 0 番地 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 山岡 秀亮 (YAMAOKA, Hideaki) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 星島 光博 (HOSHIJIMA, Mitsuhiro)

[JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 川瀬 至道 (KAWASE, Shido) [JP/JP]; 〒6110021 京都府宇治市宇治小椋 2 3 番地 ユニチカ株式会社 中央研究所内 Kyoto (JP). 黒坂 啓介 (KUROSAKA, Keisuke) [JP/JP]; 〒6110021 京都府宇治市宇治小椋 2 3 番地 ユニチカ株式会社 中央研究所内 Kyoto (JP).

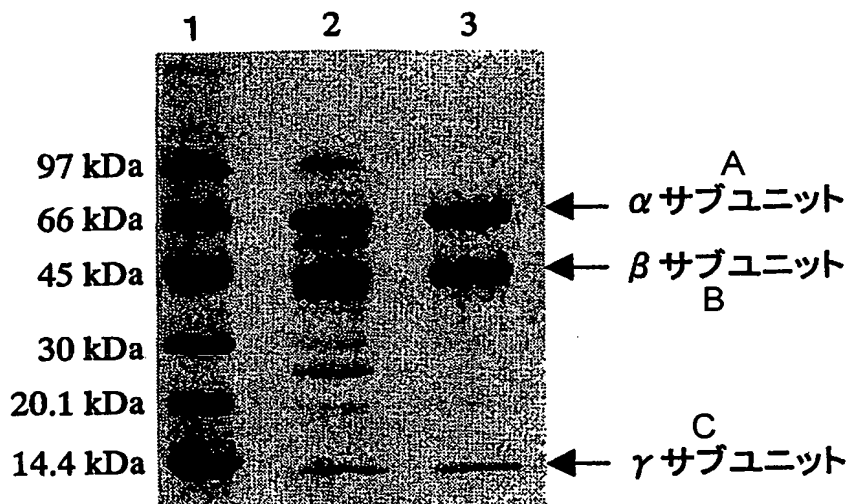
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 1 0 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,

[続葉有])

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: グルコース脱水素酵素の製造法



A... α -SUBUNIT
B... β -SUBUNIT
C... γ -SUBUNIT

(57) Abstract: A process for producing a glucose dehydrogenase complex comprising culturing a bacterium belonging to the genus *Escherichia*, which has DNAs encoding respectively the α -subunit and the β -subunit of glucose dehydrogenase of *Burkholderia cepacia* having been transferred therein in a manner allowing expression and in which the expression of the ccm (cytochrome C maturation) system is enhanced, to thereby express the above DNAs, thus allowing the production of a glucose dehydrogenase complex and then collecting the same.

(57) 要約: ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、ccm系(cytochrome C maturation system)の発現が増強されたエシェリヒア属細菌を培養して、前記DNAを発現させ、グルコー

ス脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取することにより、グルコース脱水素酵素複合体を製造する。



SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

グルコース脱水素酵素の製造法

技術分野

本発明は、ブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) のグルコース脱水素酵素複合体を大量発現するエシェリヒア属細菌、及び酵素複合体の製造方法に関する。グルコース脱水素酵素は、酵素電極を用いたグルコースセンサ等に有用である。

背景技術

グルコース脱水素酵素として、ブルクホルデリア属の微生物 (ブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) K S 1 株) が産生する酵素が知られている。同酵素は、触媒サブユニットである α サブユニット、チトクローム C である β サブユニット、及び γ サブユニットからなる複合体であり、熱安定性が高く、反応に溶存酸素の影響を受けにくい等の優れた性質を有している。同酵素の α サブユニット及び γ サブユニットをコードする DNA が単離され、 β サブユニットをコードする DNA の一部も単離された。また、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) での発現に成功している (以上、国際公開第 02/36779 号パンフレット参照)。しかしながら、発現された GDH は β サブユニットを持たないものと考えられる。

ところで、エシェリヒア・コリのチトクローム成熟系として、c c m 系 (cytochrome C maturation system) が知られている。c c m 系は、エシェリヒア・コリにおいて、嫌気下、かつ、特殊な条件下で発現することが知られている (J. Bacteriol. 177, 4321-4326 (1995))。c c m 系をコードするオペロン (c c m A B C D E F G H) の DNA 配列は既に明らかになっている (Nature 409 (6819), 529-533 (2001)、GeneBank database accession U0008 (1993))。さらに、c c m 系を発現するプラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリにおいて、異種生物由来の共有結合型マルチヘムチトクロームを好気下で発現、生産させたことが報告されている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 744-7 (1998))。

Biochim. Biophys. Acta, 1411, 114-20 (1999)、Biochim. Biophys. Acta, 1481, 18-24 (2000)、Protein Sci 9, 2074-84 (2000))。

また、c c mオペロンを含むプラスミドとして、同オペロンをp A C Y C 1 8 4に挿入して得られたプラスミドp E C 8 6 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 744-7 (1998)) が知られている。

発明の開示

本発明者らは、エシェリヒア・コリにおいて、前記グルコース脱水素酵素の α サブユニットのみを発現させた場合に比べて、 α サブユニットと β サブユニットを同時に発現させた場合はその効率が低いことを見出している。本発明は、 α サブユニットと β サブユニットを含む酵素複合体を、エシェリヒア属細菌で大量発現させる手段を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、エシェリヒア属細菌において、ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素複合体をコードするDNAの発現が、同細菌のc c m系の発現を増強することによって高めることができることを見出し、本発明を完成するに到った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、c c m系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌。

(2) α サブユニットをコードするDNAが β サブユニットをコードするDNAの上流に位置し、単一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御される(1)に記載のエシェリヒア属細菌。

(3) さらに、前記グルコース脱水素酵素の γ サブユニットをコードするDNAが発現可能な形態で導入された(1)に記載のエシェリヒア属細菌。

(4) γ サブユニットをコードするDNAが α サブユニットをコードするDNAの上流に位置する(3)に記載のエシェリヒア属細菌。

(5) 前記エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリである(1)～(4)のいずれかに記載のエシェリヒア属細菌。

(6) (1) ~ (5) のいずれかに記載のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAを発現させ、グルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

図面の簡単な説明

図1は、ブルクホルデリア・セパシアKS1株及びエシェリヒア・コリJM109/pTrc99A γ α β , pBBJMccmから精製されたGDH複合体のSDS-PAGEの結果を示す図(写真)。

レーン1: マーカー

レーン2: KS1株から精製したGDH

レーン3: JM109/pTrc99A γ α β , pBBJMccmから精製したGDH

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のエシェリヒア属細菌は、ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素(以下、単に「GDH」ともいう)の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNA(以下、各々「 α サブユニット遺伝子」及び「 β サブユニット遺伝子」ということがある)が発現可能な形態で導入され、かつ、ccm系の発現が增強されたエシェリヒア属細菌である。

前記エシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリが挙げられる。

また、前記ブルクホルデリア・セパシアとしては、KS1株、JCM2800株、JCM2801株、又はJ2315株等が挙げられる。KS1株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に受託番号FERM BP-7306として寄託されている。JCM2800株又はJCM2801株は、理化学研究所微生物系統保存施設(Japan Collection of Microorganisms, JCM)から入手することができる。また、J2315株は、American Type Culture Collection(ATCC)にATCC番号BAA-245として、The Belgian Co-ordinated Collections of Micr

o-organisms (BCCMTM)に菌株番号LNG 16656として寄託されており、これらから入手することができる。

K S 1株のGDH α サブユニット遺伝子、及び β サブユニット遺伝子の一部を含む染色体DNA断片の塩基配列を配列番号1に示す(WO 02/36779号パンフレット参照)。この塩基配列には3つのオープンリーディングフレーム(ORF)が存在し、5'末端側から2番目及び3番目のORFは、それぞれ α サブユニット(配列番号3)、及び β サブユニット(配列番号4)をコードしている。また、1番目のORFは γ サブユニット(配列番号2)をコードしていると推定される。また、配列番号9に、 β サブユニット遺伝子全長を含む断片の塩基配列を示す。さらに、 β サブユニットのアミノ酸配列を配列番号10に示す。配列番号10において、アミノ酸番号1~22はシグナルペプチドであると推定される。尚、配列番号9及び10において、第1番目のアミノ酸残基はValと記載されているが、Metである可能性が高く、また、翻訳後に脱落している可能性がある。

本発明に用いる α サブユニット遺伝子は、配列番号3に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子に限られず、コードされるポリペプチドがGDH活性を有する限り、配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものであってもよい。尚、配列番号3には、配列番号1の塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を示してあるが、N末端のメチオニン残基は、翻訳後に脱落している可能性がある。前記「1又は複数」とは、好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個、特に好ましくは1~3個である。

また、 β サブユニット遺伝子は、GDHの β サブユニットとして機能し得る限り、配列番号10のアミノ酸番号23~425からなるアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものであってもよい。前記「1又は複数」とは、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、特に好ましくは1~5個である。尚、GDHの β サブユニットとして機能するとは、GDHの酵素活性を損なわずにチトクロームCとして機能することをいう。

α サブユニット遺伝子として具体的には、配列番号1の塩基番号764～2380からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また、 α サブユニット遺伝子は、配列番号1の塩基配列の塩基番号764～2380からなる塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、GDH活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

また、 β サブユニット遺伝子として具体的には、配列番号9の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また β サブユニット遺伝子は、配列番号9の塩基番号187～1398からなる塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 β サブユニットとして機能し得るタンパク質をコードするDNAであってもよい。

前記ストリンジェントな条件としては、70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズする条件、具体的には、1×SSC、0.1%SDS、60℃が挙げられる。

α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子は、例えば、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。PCR用プライマーは、前記の塩基配列に基づいて化学合成することによって調製することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAから取得することもできる。また、ブルクホルデリア・セパシアの他の菌株からも、同様にしてバリエーションを取得することができる。

本発明においては、 α サブユニット遺伝子は β サブユニット遺伝子の上流に位置し、単一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御されることが好ましい。また、 α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子とともに、 γ サブユニットをコードするDNA（ γ サブユニット遺伝子）が発現可能な形態でエシェリヒア属細菌に導入されることが好ましい。その際、 γ サブユニット遺伝子は、 α サブユニット遺伝子の上流に位置し、単一のプロモーターによって各サブユニット遺伝子の発現が制御されることが好ましい。

γ サブユニット、 α サブユニット及び β サブユニットをこの順にコードするポリシストロニックなDNA断片は、例えば、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号12、13の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRによって取得することができる（後記実施例参照）。

α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子（必要に応じて γ サブユニット遺伝子）を含むDNA（以下、「GDH $\alpha\beta$ 遺伝子」という）を発現可能な形態でエシェリヒア属細菌に導入するには、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子をエシェリヒア属細菌で機能するベクターに挿入し、得られた組換えベクターでエシェリヒア属細菌を形質転換すればよい。その際、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子の上流にエシェリヒア属細菌で機能するプロモーターを配置することによって、同プロモーターの制御下でGDH $\alpha\beta$ 遺伝子が発現させることができる。

前記エシェリヒア属細菌で機能するベクターとしては、例えば、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pACYC184、pBBR122等が挙げられる。また、前記プロモーターとしては、例えばlac、trp、tac、trc、 P_L 、tet、PhoA等が挙げられる。また、プロモーターを含む発現ベクターの適当な部位に、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子を挿入することによって、同遺伝子のベクターへの挿入とプロモーターの連結とを同じ工程で行うことができる。このような発現ベクターとしては、pTrc99A、pBluescript、pKK223-3等が挙げられる。

また、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子は、発現可能な形態でエシェリヒア属細菌の染色体DNA中に組み込まれてもよい。

組換えベクターでエシェリヒア属細菌を形質転換するには、例えばカルシウム処理によるコンピテントセル法又はエレクトロポレーション法等が挙げられる。

本発明のエシェリヒア属細菌は、上記のようにしてGDH $\alpha\beta$ 遺伝子が導入され、かつ、ccm系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌である。

ccm系は、ccmオペロン（ccmABCDEFGHI）によってコードされている。ccmオペロンは、例えば、エシェリヒア・コリの染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。PCR用プライマーは、報告されている塩基配列（DDBJ/EMBL/GenBank ACCESSION AE005452）に基づいて合成すること

によって調製することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、エシェリヒア・コリの染色体DNAから取得することもできる。また、他のエシェリヒア属細菌からも、同様にしてバリエーションを取得することができる。

c c mオペロンとしては、前記の報告されている塩基配列を有するDNAの他、同塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、c c m系をとして機能する酵素群をコードするDNAであってもよい。

c c m系は、嫌気下、かつ、特殊な条件下で発現することが知られている（非特許文献1）。本発明において、「c c m系の発現が増強された」とは、エシェリヒア属細菌の野生株又は非改変株よりも発現量が高められたか、又は、嫌気下、かつ、特殊な条件下でなくても発現するように改変されたことをいう。嫌気下、かつ、特殊な条件下ではない条件としては、好気性条件下が挙げられる。

c c m系の発現を増強するには、c c mオペロンの各遺伝子を、構成的に発現するプロモーター、又は発現制御が可能なプロモーターに連結し、得られた組換え遺伝子をエシェリヒア属細菌に導入すればよい。好適なプロモーター及びベクター、並びにエシェリヒア属細菌へのc c mオペロンの導入は、前記GDH α β 遺伝子について記載したのと同様である。

c c mオペロンを含むプラスミドとして、同オペロンがpACYC184に挿入して得られたpEC86が挙げられる。同オペロンは、tetプロモーターの制御下で構成的に発現する。また、エシェリヒア属細菌の染色体DNA上のc c mオペロンをPCR等によりクローニングし、適当なプロモーターの支配下に挿入したプラスミドを作製することもできる。

また、エシェリヒア属細菌の染色体DNA上のc c mオペロンのプロモーターを、適当なプロモーターに置換することによっても、同オペロンの発現を増強することができる。

本発明のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子を発現させ、これらの発現産物としてGDH酵素複合体を産生させ、これを採取することにより、GDH複合体を効率よく製造することができる。ここ

で、「GDH複合体」とは、好ましくは各サブユニットが会合して多量体タンパク質を形成しているものをいうが、遊離した各サブユニットの混合物も含まれる。

エシェリヒア属細菌の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

培地の栄養源としては、エシェリヒア属細菌の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ガラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は、エシェリヒア属細菌が生育し、GDH複合体を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDH複合体が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12～72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、GDH複合体を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

GDH複合体は、培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、GDH複合体が培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、GDH複合体を含有する溶液とエシェリヒア属細菌菌体と分離した後に利用される。GDH複合体が菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加して各サブユニットを可溶化し、水溶液として分離採取する。

上記のようにして得られたGDH複合体含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈

殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製を行うことにより、精製されたGDH複合体を得ることができる。カラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。

尚、GDHは α サブユニット単独でも酵素活性を示す。したがって、本発明のエシェリヒア属細菌又はGDH複合体から、 α サブユニットのみを単離、精製して使用することもできる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例 1 ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH β サブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH β サブユニットの検索

Sanger Centre のブルクホルデリア・セパシアJ2315株ゲノムデータベース(<http://www.sanger.ac.uk/>)を用いて、KS1株由来GDHの β サブユニット遺伝子を検索した。すでに明らかにされているKS1株GDH β サブユニットのN末端配列（配列番号5）を参考に、アセトバクターS p.、グルコノバクターS p. 由来のアルコール脱水素酵素（Tamaki T. et al., Biochim Biophys Acta 1088(2):292-300 (1991)、Matsushita K., et al., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 304-310 (1992)、Takemura H., et al., J Bacteriol, 175, 6857-66 (1993)、Kondo K. et al., Appl Environ Microbiol, 63, 1131-8 (1997)）、エルビニアs p.、シュードモナスs p. 由来のグルコン酸脱水素酵素（Yum DY, et al., J Bacteriol, 179, 6566-72, (1997)、Matsushita K. et al., J Biochem, 85, 1173-81 (1979)）、グルコノバイターs p. 由来のソルビトール脱水素酵素（Choi, E.S., et al., FEMS Microbiol. Lett., 125, 45-50 (1995)）、エルビニアs p.、パントエアs p. 由来の2-ケトグルコン酸脱水素酵素（Pujol CJ et al., J Bacteriol,

182,2230-7, (2000)) のチトクロム c サブユニットとホモロジーの高いアミノ酸配列 (配列番号 6) をデザインした。

上記アミノ酸配列を指標として、前記ブルクホルデリア・セパシア J2315 株のデータベースから BLAST を用いてホモロジーの高いアミノ酸配列をコードしている遺伝子配列を検索した。つぎに、得られた 5 つの配列に対して、KS1 株 GDH α サブユニットの C 末端配列とのホモロジーを検索した結果、2 つの遺伝子断片から翻訳されるアミノ酸配列が高いホモロジー (>90%) を示した。各遺伝子断片は 200~500bp と短かったので、これらの配列に対して相同性の高い配列を、BLAST を用いてブルクホルデリア・セパシア J2315 株のゲノムデータベースから検索し、各断片をつなぎ合わせた。その結果、3110bp の断片を得た。得られた塩基配列には GDH の C 末端と思われる ORF と 1275bp からなるチトクロム c 構造遺伝子と思われる ORF が存在した。得られた J2315 株の塩基配列と既にクローニングされている KS1 株 α サブユニット塩基配列を比較した結果、 α サブユニット下流には J2315 株チトクロム c のシグナルペプチドをコードする塩基配列に相同性の高い塩基配列が含まれていた。

以上のことから、すでにクローニングされているブルクホルデリア・セパシア KS1 株の GDH 遺伝子 (配列番号 1、WO 02/36779 号パンフレット参照) の三番目の ORF (配列番号 1 の塩基番号 2386 以降) は、 β -サブユニットをコードしていると推定された。また、精製された β -サブユニットの N 末端におけるアミノ酸配列と、配列番号 1 中の塩基番号 2452~2466 の塩基配列によって翻訳される 5 アミノ酸残基が一致したことから、前記 ORF は β サブユニットをコードしていると考えられた。

<2> インバース PCR 法を用いた β サブユニット構造遺伝子の増幅

(1) 菌体の培養及びゲノムの抽出

KS1 株を 5ml の完全培地 (0.5% polypepton、0.3% yeast extract、0.5% NaCl) を用いて 37℃ で一晩振とう培養した。得られた菌体から GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いてゲノムを抽出した。方法は付属のマニュアルに従った。得られたゲノムに対してフ

エノール/クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿させた後、精製水に溶解した。

(2) ゲノム断片の環状化

KS1株より抽出したゲノムを、BamHI、EcoRI、HindIII、SmaI、SacIおよびXhoIで消化し、エタノール沈殿によってゲノム断片を回収した。制限酵素消化したゲノム1 μ gをDNAライゲーションキット（宝酒造(株)）を用いて16℃で一晩ライゲーション反応を行った。

(3) PCR

KS1株GDH β サブユニットのN末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたフォワードプライマー（EF1配列番号7）50pmol，リバープライマー（ER1配列番号8）50pmol（プライマーはいずれもInvitrogen社に依頼合成）、LATAq（宝バイオ(株)）0.5ml、dNTP溶液8 μ l、10 \times PCR buffer 5 μ lに精製水を全量50 μ lとなるように加え、プログラムテンプコントロールシステム PC-801（ASTECH）を用いてPCRを行った。PCRの反応は、以下の条件で行った。94℃ 5分、98℃ 20秒、62℃ 30秒を30サイクルの後、72℃ 6分、72℃ 10分。

SmaIで制限酵素消化したゲノムをテンプレートとした場合において、約2.1kbpの大きさの断片がアガロース電気泳動で確認された。

<3>PCR増幅断片のシーケンシング

(1) TAクローニング

前記のインパースPCR産物をアガロースゲル電気泳動後、バンドを切り出し、Gene clean II KIT（Bio101 inc.）を用いて精製した。この断片を、pGEMR-T and pGEMR-T EASY Vector Systems（Promega）を用いて、pGEM-T Vectorにライゲーションした。ライゲーションを行ったベクターでエシェリヒア・コリDH5 α を形質転換し、アンピシリン50 μ g/ml、X-Gal 40 μ g/ml、IPTG 0.1 μ Mを含むL寒天培地を用いて一晩培養した。出現したコロニーから白色のコロニーを選択し、アンピシリン50 μ g/mlを含むL培地で一晩培養して、菌体からプラスドをアルカリ法により抽出した。

(2) シーケンスサンプルの調製

得られたプラスミドをRNase処理し、これに0.6倍量の20% PEG6000/2.5M NaClを加え、氷上に1時間放置した。その後15000r.p.m、4℃で15分間遠心分離し、ペレットを得た。これを70%エタノールで洗浄し、ペレットを真空乾燥させた。これを精製水に溶解した。

(3) DNA塩基配列の解析

(2) で得られたプラスミドの挿入断片の塩基配列を、ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (PERKIN-ELMER Applied Biosystems)を用いて解析した。ベクターのマルチクローニングサイトからM13プライマーを用いて挿入断片の一部の配列を決定した結果、これまでに解析されているβサブユニットN末端を含む塩基配列が確認された。この配列を手がかりにプライマーを順次作製して用い、挿入断片の塩基配列を決定した。結果を配列番号9に示す。また、この塩基配列に含まれるORFがコードするアミノ酸配列を配列番号10に示す。

βサブユニットは、全部で425個のアミノ酸残基から構成されており、すでに得られているN末端アミノ酸配列と比較して、そのうち22残基はシグナルペプチドであると考えらる。アミノ酸配列から計算される分子量は45,276Daであり、シグナルペプチドを除いた分子量42,731Daは、SDS-PAGEから求められたKS1株GDHβサブユニットの分子量43kDaと同等の値であった。βサブユニットのアミノ酸配列中には、チトクロームcにおいてヘムとの結合モチーフ(配列番号11)が3ヶ所に確認された。このORFはαサブユニット構造遺伝子のORFのすぐ下流に位置し、開始コドンの上流にSD配列と思われる配列が存在した。

得られたアミノ酸配列についてBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のチトクロームcサブユニットと65%、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) 由来のソルビトール脱水素酵素のチトクロームcサブユニットと48%、エルビニア・シプリペディイ (*Eriwinia cypripedii*) 由来のグルコン酸脱水素酵素のチトクロームcサブユニットと44%、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 由来2-ケトグルコン酸脱水素酵素のチトクロームcサブユニットとアミノ酸レベルで46.4%と、全体にわたって高い相同性を示していた。またこれらのチトクロームcのアミノ酸配列中には、ヘム結

合モチーフ（配列番号 1 1）配列が保存されていた。

尚、KS1株のGDH β サブユニット構造遺伝子は、J2315株のGDH β サブユニット構造遺伝子と、塩基配列レベルで 92.0%、アミノ酸レベルで 92.2%の相同性を有している。

実施例 2 エシェリヒア・コリへのGDH $\alpha\beta$ 遺伝子の導入及び c c m 系の増強

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株からの染色体DNAの調製

ブルクホルデリア・セパシア KS1株より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をTL液体培地（ポリペプトン 10g、酵母抽出液 1g、NaCl 5g、KH₂PO₄ 2g、グルコース 5g；1L、pH 7.2）を用いて、34℃で一晩振盪した。増殖した菌体を遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 μ g/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノールクロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

<2>GDH $\alpha\beta$ 遺伝子の調製

前記染色体DNAを鋳型として、以下の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRにより、GDHの γ サブユニット、 α サブユニット及び β サブユニットをコードするDNA断片を増幅した。

<フォワードプライマー：cF1>

5'-CATGCCATGGCACACAACGACAACAC-3'（配列番号 1 2）

<リバースプライマー：GDHbU1>

5'-GTCGACGATCTTCTTCCAGCCGAACATCAC-3'（配列番号 1 3）

増幅した断片のC末端側を平滑末端化した後、N末端側をNcoIで消化し、同様に処理したpTrc99A（Pharmacia社）にライゲーションした。得られた組換えベクターでE. coli DH5 α を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mLを含むLB寒天培地で生

じるコロニーを採取した。得られた形質転換体を液体のLB培地で培養してプラスミドを抽出し、その挿入DNA断片を解析したところ、約3.8kbの挿入断片が確認された。本プラスミドをpTrc99A γ α β と命名した。本プラスミド中のGDH α β 遺伝子は、trcプロモーターによって制御される。pTrc99A γ α β は、アンピシリン耐性遺伝子を保持している。

<3>c c m系プラスミドの調製

pTrc99A γ α β をEcoT22Iで消化した後に末端を平滑化した。次にNotIで消化して、アガロースゲル電気泳動により短いDNA断片を分離、回収した。このDNA断片をScaIとNotIで消化したpBBR122 (MoBiTec社)に挿入して、pBBGDH γ α β を作製した。

E. coli JM109より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をLB培地 (ポリペプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 10g ; 1L、pH7.0) を用いて37℃で一夜振盪培養した。増殖した菌体を遠心分離により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 μ g/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノール-クロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくい取り、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、JM109染色体DNA溶液とした。

JM109染色体DNAを鋳型として、以下に配列を示すオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRによりc c m系遺伝子をコードするDNA断片を増幅した。

<フォワードプライマー: ECccmD1>

5' - TGGCCATGGTTGAAGCCAGAGAGTTACTTT -3' (配列番号14)

<リバースプライマー: ECccmU1>

5' - TTATTTACTCTCCTGCGGCGACAAATGTTG -3' (配列番号15)

増幅した末端を平滑化した後、N末端側をNcoIで消化した。この断片をACCIで消化、平滑末端化した後、NcoIで消化したpBBGDH γ α β とライゲーションしてpB

BJMccmを作製した。尚、pBBGDH γ α β をAccIで消化、平滑末端化した後、NcoIで消化することにより、GDH α β 遺伝子は削除されている。

<4>GDH α β 遺伝子及びccm系のエシェリヒア・コリへの導入

E. coli JM109をpTrc99A γ α β 及びpBBJMccmで形質転換し、JM109/pTrc99A γ α β 、pBBJMccmを得た。また、コントロールとしてpTrc99A γ α β でE. coli JM109を形質転換したJM109/pTrc99A γ α β を得た。

これらの形質転換体を50 μ g/mlアンピシリンと50 μ g/mlカナマイシン（JM109/pTrc99A γ α β 、pBBJMccm）、または50 μ g/mlアンピシリン（JM109/pTrc99A γ α β ）を含む10mLの2 \times YT培地で34 $^{\circ}$ C、1夜振盪培養した。また、ブルクホルデリア・セパシアKS1株を10mLの完全培地で1夜振盪培養した。培養液の一部から遠心分離により各菌体を回収し、遠心分離前の液量になるように1%コール酸ナトリウムを含む10mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）を加えた後に超音波により細胞を破碎した。次に、破碎液を遠心分離した上清中のGDH活性を測定した。

GDH活性は次の操作にて測定した。47mMリン酸緩衝液pH6.0、20mMグルコース、2mMフェナジンメトサルフェート、0.1mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを、37 $^{\circ}$ Cで予め加温した後にサンプルを加えて反応を開始し、37 $^{\circ}$ Cに保ち、600nmの吸光度変化を測定して求めた。GDH活性は、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールの分子吸光係数4.76mM/cmを用いて、酵素1単位（U）は1分毎に1 μ モルの2,6-ジクロロフェノールインドフェノールが酸化される量と定義して求めた。

結果は、JM109/pTrc99A γ α β 、ブルクホルデリア・セパシアKS1、JM109/pTrc99A γ α β 、pBBJMccmのGDH活性は、それぞれ、0.3U/mL、1.4U/mL、32U/mLであった。すなわち、JM109/pTrc99A γ α β にはGDH活性がほとんど認められず、野生株であるブルクホルデリア・セパシアKS1にはGDH活性がわずかであったが、JM109/pTrc99A γ α β 、pBBJMccmでは非常に高いGDH活性が認められた。尚、JM109/pTrc99A γ α β 、pBBJMccmからGDH複合体を精製し、SDS-PAGEを行ったところ、KS1株から精製したGDH複合体と同様の泳動パターンを示すことが確認できた（図1）。

産業上の利用の可能性

本発明により、ブルクホルデリア・セバシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニットと β サブユニットを含む酵素複合体を、エシェリヒア属細菌で大量発現させることができる。

請求の範囲

1. ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、c c m系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌。
2. α サブユニットをコードするDNAが β サブユニットをコードするDNAの上流に位置し、単一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御される請求項1に記載のエシェリヒア属細菌。
3. さらに、前記グルコース脱水素酵素の γ サブユニットをコードするDNAが発現可能な形態で導入された請求項1に記載のエシェリヒア属細菌。
4. γ サブユニットをコードするDNAが α サブユニットをコードするDNAの上流に位置する請求項3に記載のエシェリヒア属細菌。
5. 前記エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリである請求項1～4のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌。
6. 請求項1～5のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAを発現させ、グルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

1/1

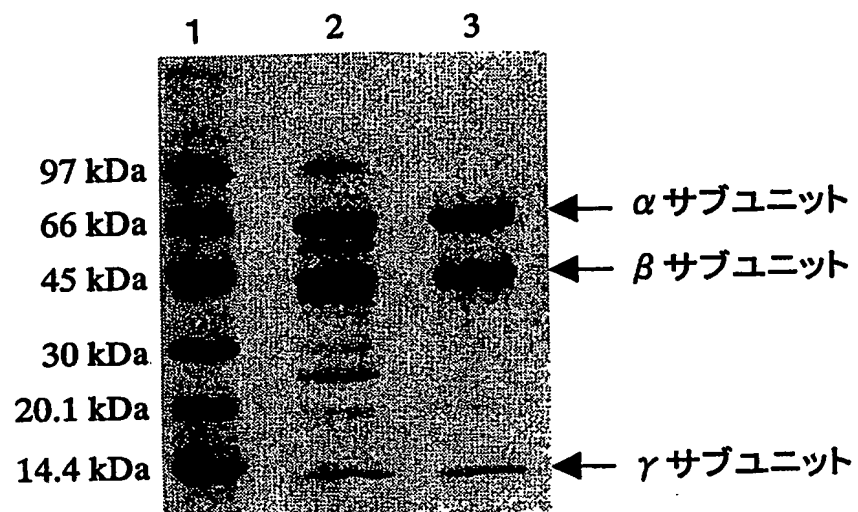


Fig. 1

SEQUENCE LISTING

<110> Arkray, Inc.
Unitika Ltd.

<120> Method for producing glucose dehydrogenase

<130> G843-OPC4051

<150> JP 2003-82739

<151> 2003-03-25

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2467

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (258).. (761)

<220>

<221> CDS

<222> (764).. (2380)

<220>

<221> CDS

<222> (2386).. (2466)

<400> 1

```

aagctttctg tttgattgca cgcgattcta accgagcgtc tgtgaggcgg aacgcgacat 60
gcttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggctgatcgt 120
tacgaatggc tgacacattg aatggactat aaaaccattg tccgttcggg aatgtgcgcg 180
tacatttcag gtccgcgccg atttttgaga aatatcaagc gtggttttcc cgaatccggt 240
gttcgagaga aggaaac atg cac aac gac aac act ccc cac tcg cgt cgc      290

```

Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg

1

5

10

```

cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa      338
His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln

```

15

20

25

ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tgc ctg aca ttg	386
Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu	
30 35 40	
cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg	434
Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met	
45 50 55	
acg ctt tcc gaa tgc ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc	482
Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile	
60 65 70 75	
ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tgc ttc aag acg gcc	530
Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala	
80 85 90	
gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc gcg tcc ggt tgc ctg acg	578
Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr	
95 100 105	
cct gaa cag gaa tgc ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc	626
Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu	
110 115 120	
ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc	674
Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe	
125 130 135	
ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tgc tat tgc ccc aac aaa	722
Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys	
140 145 150 155	
ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc	769
Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala	
160 165 170	
gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtt gga tgc ggt gtc	817
Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val	
175 180 185	
gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg	865
Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val	
190 195 200	
atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag	913
Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu	
205 210 215	
cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg	961
Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro	
220 225 230	
tgc agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac	1009
Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr	
235 240 245 250	
ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tgc cag tac atc cgc gcg	1057

3/13

Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	Glu	His	Lys	Phe	Asn	Ser	Gln	Tyr	Ile	Arg	Ala	
				255					260					265		
gtg	ggc	ggc	acg	acg	tgg	cac	tgg	gcc	gcg	tcg	gcg	tgg	cgc	ttc	att	1105
Val	Gly	Gly	Thr	Thr	Trp	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	
			270					275					280			
ccg	aac	gac	ttc	aag	atg	aag	agc	gtg	tac	ggc	gtc	ggc	cgc	gac	tgg	1153
Pro	Asn	Asp	Phe	Lys	Met	Lys	Ser	Val	Tyr	Gly	Val	Gly	Arg	Asp	Trp	
		285					290					295				
ccg	atc	cag	tac	gac	gat	ctc	gag	ccg	tac	tat	cag	cgc	gcg	gag	gaa	1201
Pro	Ile	Gln	Tyr	Asp	Asp	Leu	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Ala	Glu	Glu	
	300					305					310					
gag	ctc	ggc	gtg	tgg	ggc	ccg	ggc	ccc	gag	gaa	gat	ctg	tac	tcg	ccg	1249
Glu	Leu	Gly	Val	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Glu	Asp	Leu	Tyr	Ser	Pro	
315					320				325						330	
cgc	aag	cag	ccg	tat	ccg	atg	ccg	ccg	ctg	ccg	ttg	tcg	ttc	aac	gag	1297
Arg	Lys	Gln	Pro	Tyr	Pro	Met	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Ser	Phe	Asn	Glu	
			335					340					345			
cag	acc	atc	aag	acg	gcg	ctg	aac	aac	tac	gat	ccg	aag	ttc	cat	gtc	1345
Gln	Thr	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Asn	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	His	Val	
		350					355					360				
gtg	acc	gag	ccg	gtc	gcg	cgc	aac	agc	cgc	ccg	tac	gac	ggc	cgc	ccg	1393
Val	Thr	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Asn	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asp	Gly	Arg	Pro	
	365						370				375					
act	tgt	tgc	ggc	aac	aac	aac	tgc	atg	ccg	atc	tgc	ccg	atc	ggc	gcg	1441
Thr	Cys	Cys	Gly	Asn	Asn	Asn	Cys	Met	Pro	Ile	Cys	Pro	Ile	Gly	Ala	
	380				385						390					
atg	tac	aac	ggc	atc	gtg	cac	gtc	gag	aag	gcc	gaa	cgc	gcc	ggc	gcg	1489
Met	Tyr	Asn	Gly	Ile	Val	His	Val	Glu	Lys	Ala	Glu	Arg	Ala	Gly	Ala	
395					400				405						410	
aag	ctg	atc	gag	aac	gcg	gtc	gtc	tac	aag	ctc	gag	acg	ggc	ccg	gac	1537
Lys	Leu	Ile	Glu	Asn	Ala	Val	Val	Tyr	Lys	Leu	Glu	Thr	Gly	Pro	Asp	
			415					420					425			
aag	cgc	atc	gtc	gcg	gcg	ctc	tac	aag	gac	aag	acg	ggc	gcc	gag	cat	1585
Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Ala	Leu	Tyr	Lys	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	Glu	His	
		430					435					440				
cgc	gtc	gaa	ggc	aag	tat	ttc	gtg	ctc	gcc	gcg	aac	ggc	atc	gag	acg	1633
Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Tyr	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Ile	Glu	Thr	
	445						450				455					
ccg	aag	atc	ctg	ctg	atg	tcc	gcg	aac	cgc	gat	ttc	ccg	aac	ggt	gtc	1681
Pro	Lys	Ile	Leu	Leu	Met	Ser	Ala	Asn	Arg	Asp	Phe	Pro	Asn	Gly	Val	
	460				465				470							
gcg	aac	agc	tcg	gac	atg	gtc	ggc	cgc	aac	ctg	atg	gac	cat	ccg	ggc	1729
Ala	Asn	Ser	Ser	Asp	Met	Val	Gly	Arg	Asn	Leu	Met	Asp	His	Pro	Gly	

4/13

475	480	485	490	
acc ggc gtg tcg ttc tat gcg agc gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc				1777
Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly				
	495	500	505	
ccg cag gag atg acg tcg ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc				1825
Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg				
	510	515	520	
gcg acc gaa gcg gcg aag aag atc cac ctg tcg aac ctg tcg cgc atc				1873
Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile				
	525	530	535	
gac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc				1921
Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro				
	540	545	550	
gac gag ctc gac gcg cag atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag				1969
Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln				
	555	560	565	570
ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg				2017
Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val				
	575	580	585	
ccg agc aag acg gcg acc gat gcg atc ggc att ccg cgc ccc gag atc				2065
Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile				
	590	595	600	
acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc gcc gcg cat acg cgc				2113
Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg				
	605	610	615	
gag gtc tac gcg acc gcc gcg aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg				2161
Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val				
	620	625	630	
ttc aac gac gaa ttc gcg ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc				2209
Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile				
	635	640	645	650
atg ggc gcc gat gcg cgc gac tcc gtc gtc gac aag gac tgc cgc acg				2257
Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr				
	655	660	665	
ttc gac cat ccg aac ctg ttc att tcg agc agc gcg acg atg ccg acc				2305
Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr				
	670	675	680	
gtc ggt acc gta aac gtg acg ctg acg atc gcc gcg ctc gcg ctg cgg				2353
Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg				
	685	690	695	
atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tgacc gtg cgg aaa tct act ctc				2403
Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val Val Arg Lys Ser Thr Leu				
	700	705	710	

act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg ccg ggc ttc gcg cgc gcg 2451
Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe Ala Arg Ala
715 720 725

gcc gat gcg gcc gat c 2467
Ala Asp Ala Ala Asp
730

<213> Burkholderia cepacia

[illegible]

<213> Burkholderia cepacia

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
1 5 10 15

6/13

Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30
 Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45
 Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60
 Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80
 Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95
 Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
 100 105 110
 Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg
 115 120 125
 Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala
 130 135 140
 Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175
 Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190
 His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
 195 200 205
 Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
 210 215 220
 Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
 245 250 255
 Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
 260 265 270
 Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
 275 280 285
 Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn
 290 295 300
 Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
 305 310 315 320
 Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly
 325 330 335
 Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro
 340 345 350
 Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser

7/13

355	360	365
Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met		
370	375	380
Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr		
385	390	395
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg		
405	410	415
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro		
420	425	430
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His		
435	440	445
Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp		
450	455	460
Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser		
465	470	475
Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys		
485	490	495
Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met		
500	505	510
Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala		
515	520	525
Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val		
530	535	

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 4

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
1 5 10 15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp
20 25

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 5

Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala
1 5 10 15

8/13

<210> 6
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:consensus

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (6, 17, 18, 19, 22)
 <223> Xaa=unknown

<400> 6
 Ala Asp Ala Ala Asp Xaa Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Asp Cys Xaa Ala Cys His
 20 25

<210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7
 tgcaccgtgc ggaaatctac tctcact 27

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
 acttccttct tcagcgtgtc cgacatc 27

<210> 9

9/13

<211> 1441

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (121)..(1398)

<400> 9

```

tccgaacctg ttcatttcga gcagcgcgac gatgccgacc gtcggtaccg taaacgtgac 60
gctgacgata gccgcgctcg cgctgcggat gtcggacacg ctgaagaagg aagtctgacc 120
gtg cgg aaa tct act ctc act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg 168
Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
      1              5              10              15
ccg ggc ttc gcg cgc gcg gcc gat gcg gcc gat ccg gcg ctg gtc aag 216
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
              20              25              30
cgc ggc gaa tac ctc gcg acc gcc atg ccg gta ccg atg ctc ggc aag 264
Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys
              35              40              45
atc tac acg agc aac atc acg ccc gat ccc gat acg ggc gac tgc atg 312
Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met
              50              55              60
gcc tgc cac acc gtg aag ggc ggc aag ccg tac gcg ggc ggc ctt ggc 360
Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly
              65              70              75              80
ggc atc ggc aaa tgg acg ttc gag gac ttc gag cgc gcg gtg cgg cac 408
Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His
              85              90              95
ggc gtg tcg aag aac ggc gac aac ctg tat ccg gcg atg ccg tac gtg 456
Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
              100              105              110
tcg tac gcg aag atc aag gac gac gac gta cgc gcg ctg tac gcc tac 504
Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
              115              120              125
ttc atg cac ggc gtc gag ccg gtc aag cag gcg ccg ccg aag aac gag 552
Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
              130              135              140
atc cca gcg ctg cta agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc tgg aac tgg 600
Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp
              145              150              155              160
ctg ttc ctg aag gac ggc ccg tac cag ccg aag ccg tcg cag agc gcc 648
Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala

```

10/13

	165	170	175	
gaa tgg aat cgc ggc gcg tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc				696
Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser				
	180	185	190	
acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag tgc ctc gac				744
Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp				
	195	200	205	
gaa acc ggc ggc agc ttc ctc gcg ggg tgc gtg ctc gcc ggc tgg gac				792
Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp				
	210	215	220	
ggc tac aac atc acg tgc gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg				840
Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr				
	225	230	235	240
cag cag cag ctc gtg cag tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc				888
Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val				
	245	250	255	
gcg cag gcg gcc ggg ccg atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tgc				936
Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser				
	260	265	270	
aag atg acc gaa gcg gac atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg				984
Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr				
	275	280	285	
gtg ccg gcc gtt gcc gac agc aac gcg aag cag ccg cgg tgc tgc tgg				1032
Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp				
	290	295	300	
ggc aag ccg gcc gag gac ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcg				1080
Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala				
	305	310	315	320
tgc tgc ggc atc gat ccg gcg cgg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg				1128
Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr				
	325	330	335	
tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tgc				1176
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser				
	340	345	350	
ctg ttc cac aac tcc acc gtc ggc gcg tgc aat ccg tgc aac ctc gtg				1224
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val				
	355	360	365	
cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc				1272
Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile				
	370	375	380	
ggg atg ccc gct ttc cgc tac gat ctg aac gac gcg cag atc gcc gcg				1320
Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala				
	385	390	395	400

11/13

ctg acg aac tac gtg acc gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg 1368
 Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
 405 410 415
 acg gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga catagtcggg cgcgccgaca 1418
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 420 425
 cggcgcaacc gataggacag gag 1441

<210> 10

<211> 425

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 10

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
 20 25 30
 Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys
 35 40 45
 Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met
 50 55 60
 Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His
 85 90 95
 Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
 100 105 110
 Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
 115 120 125
 Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
 130 135 140
 Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp
 145 150 155 160
 Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala
 165 170 175
 Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser
 180 185 190
 Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp
 195 200 205
 Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp
 210 215 220
 Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr

12/13

225		230		235		240									
Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Gln	Tyr	Leu	Arg	Thr	Gly	Ser	Val	Pro	Gly	Val
				245						250					255
Ala	Gln	Ala	Ala	Gly	Pro	Met	Ala	Glu	Ala	Val	Glu	His	Ser	Phe	Ser
			260						265					270	
Lys	Met	Thr	Glu	Ala	Asp	Ile	Gly	Ala	Ile	Ala	Thr	Tyr	Val	Arg	Thr
		275					280					285			
Val	Pro	Ala	Val	Ala	Asp	Ser	Asn	Ala	Lys	Gln	Pro	Arg	Ser	Ser	Trp
	290					295					300				
Gly	Lys	Pro	Ala	Glu	Asp	Gly	Leu	Lys	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Leu	Ala
305					310					315					320
Ser	Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Ala	Arg	Leu	Tyr	Leu	Gly	Asn	Cys	Ala	Thr
			325						330					335	
Cys	His	Gln	Met	Gln	Gly	Lys	Gly	Thr	Pro	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Ser
		340						345					350		
Leu	Phe	His	Asn	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Asn	Leu	Val
	355						360					365			
Gln	Val	Ile	Leu	Asn	Gly	Val	Gln	Arg	Lys	Ile	Gly	Ser	Glu	Asp	Ile
	370				375						380				
Gly	Met	Pro	Ala	Phe	Arg	Tyr	Asp	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Ala
385					390					395					400
Leu	Thr	Asn	Tyr	Val	Thr	Ala	Gln	Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala	Lys	Val
			405						410					415	
Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Lys	Leu	Arg							
			420					425							

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: heme binding motif

<220>

<221> UNSURE

<222> (2, 3)

<223> Xaa=unknown

<400> 11

Cys Xaa Xaa Cys His

1

5

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
catgccatgg cacacaacga caacac 26

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13
gtcgacgatc ttcttccagc cgaacatcac 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14
tggccatggt tgaagccaga gagttacttt 30

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15
ttatittactc tcctgcggcg acaaattgtg 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/21, C12N9/04, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/21, C12N9/04, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y1	WO 02/36779 A (Koji SODE), 10 May, 2002 (10.05.02), & AU 1099102 A & CA 2427031 A & EP 1331272 A	1-6
Y1	INOSE, K. et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli. Biochim.Biophys.Acta., 21 February, 2003 (21.02.03), Vol.1645(2), pages 133 to 138	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 April, 2004 (16.04.04)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004074

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y2	REINCKE, B. et al., Heterologous expression of soluble fragments of cytochrome c552 acting as electron donor to the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase. Biochim. Biophys.Acta., 21 April, 1999 (21.04.99), Vol.1411(1), pages 114 to 120	1-6
Y2	HERBAUD, ML. et al., Escherichia coli is able to produce heterologous tetraheme cytochrome c(3) when the ccm genes are co-expressed, Biochim.Biophys.Acta., 31 August, 2000 (31.08.00), Vol.1481(1), pages 18 to 24	1-6
P,Y	JP 2003-274964 A (Koji SODE), 30 September, 2003 (30.09.03), (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 1/21, C12N 9/04, C12N 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 1/21, C12N 9/04, C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y1	WO 02/36779 A(早出広司)2002.05.10 & AU 1099102 A & CA 2427031 A & EP 1331272 A	1-6
Y1	INOSE, K et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli. Biochim Biophys Acta. 2003 Feb 21, vol.1645(2), pp.133-138	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y2	REINCKE, B et al., Heterologous expression of soluble fragments of cytochrome c552 acting as electron donor to the <i>Paracoccus denitrificans</i> cytochrome c oxidase. <i>Biochim Biophys Acta</i> . 1999 Apr 21, vol.1411(1), pp.114-120	1-6
Y2	HERBAUD, ML et al., <i>Escherichia coli</i> is able to produce heterologous tetraheme cytochrome c(3) when the <i>ccm</i> genes are co-expressed. <i>Biochim Biophys Acta</i> . 2000 Aug 31, vol.1481(1), p.18-24	1-6
PY	JP 2003-274964 A(早出広司)2003.09.30 (ファミリーなし)	1-6